

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2010. 08. 003

香加皮杠柳苷对 MCF-7 细胞周期及 p21^{WAF1/CIP1} 表达的影响

张 静¹, 杨 光², 单保恩¹, 张 超¹

Effects of Periplocin from Cortex Periplocae on Cell Cycle of MCF-7 Cells and Expression of p21^{WAF1/CIP1}

ZHANG Jing¹, YANG Guang², SHAN Bao-en¹, ZHANG Chao¹

1. Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China, 2. Department of Radiology

Corresponding Author: SHAN Bao-en, E-mail: baoenshan@yahoo. com. cn

Abstract: Objective To study the effect of Periplocin from Cortex Periplocae (CPP) on cell cycle of MCF-7 cells and expression of p21^{WAF1/CIP1}, and demonstrate the possible mechanism of anti-tumor. **Methods** Inhibitory effects of CPP in different concentrations (1. 25, 2. 50, 5. 00, 10. 00, 20. 00 ng/ml) and different time (24, 48, 72 h) on proliferation of MCF-7 were detected by MTT. The changes of cell cycle of tumor cells treated with CPP under different concentrations (2. 50, 5. 00, 10. 00ng/ml) and various time (6, 12, 24, 48, 72 h) were detected using flow cytometry, respectively. Expression of cell cycle associated gene p21^{WAF1/CIP1} was assessed by semi-quantitative RT-PCR and SP immunocytochemistry method. **Results** A dose and time-dependent proliferation inhibition of CPP was demonstrated in MCF-7 with IC₅₀ value (for 48h) of (4. 88 ± 0. 16) ng/ml. Compared to control group, the number of G₀/G₁ phase cells increased markedly, but which of S and G₂/M phase cells decreased, after treatment with CPP for 24 hours, the difference was significant (P<0. 05); in 5. 00 ng/ml group, the proportion of tumor cells in the G₀/G₁ phase was increased from (49. 33 ± 3. 25)% to (79. 47 ± 2. 40)%, the proportion of S and G₂/M phase cells was decreased from (28. 47 ± 1. 59)% and (22. 20 ± 2. 09)% to (10. 13 ± 3. 26)% and (10. 40 ± 1. 41)%, respectively. p21^{WAF1/CIP1} mRNA level increased obviously in MCF-7 cells exposed to CPP, the ratio of p21^{WAF1/CIP1} to β-actin was much higher, compared with that in control group (P<0. 05). The result of immunocytochemistry indicated that p21^{WAF1/CIP1} protein expression increased obviously in MCF-7 cells exposed to CPP in concentration-dependent manner. p21^{WAF1/CIP1} protein showed stronger positive staining in cells with 10. 00 ng/ml CPP treatment. **Conclusion** CPP has marked anti-tumor effect *in vitro*, its curative dose is small, the IC₅₀ was (4. 88 ± 0. 16)ng/ml. CPP could hinder the cell cycle of MCF-7 cells at G₀/G₁ phase. CPP elevated mRNA and protein expression of cell cycle associated gene p21^{WAF1/CIP1}. The result suggested that blocking the cell cycle may be one of its anti-tumor mechanisms *in vitro*.

Key words: Periplocin from Cortex Periplocae; Breast cancer; Antitumor; Cell cycle

摘 要:目的 研究香加皮杠柳苷(CPP)对人乳腺癌 MCF-7 细胞周期及 p21^{WAF1/CIP1} 表达的影响,探讨其抗肿瘤作用及作用机制。**方法** 采用 MTT 法检测不同浓度 CPP(1. 25、2. 50、5. 00、10. 00、20. 00 ng/ml)作用不同时间(24、48、72 h)对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用;应用流式细胞术分析不同浓度 CPP (2. 50、5. 00、10. 00 ng/ml)分别作用于 MCF-7 细胞 6、12、24、48、72 h 对肿瘤细胞周期的影响;并采用 RT-PCR 和免疫细胞化学技术检测细胞周期相关因子 p21^{WAF1/CIP1} 的表达。**结果** CPP 能明显抑制 MCF-7 细胞的增殖,并呈浓度及时间依赖性,作用于 MCF-7 细胞 48 h 的 IC₅₀ 为(4. 88 ± 0. 16)

收稿日期:2008-11-17;修回日期:2008-12-30
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772752)
作者单位:1. 050011 石家庄,河北医科大学第四医院科研中心,2. 放射科
通信作者:单保恩,E-mail: baoenshan@yahoo. com. cn
作者简介:张静(1971-),女,博士,副教授,主要从事抗肿瘤研究

ng/ml。流式细胞术结果显示,CPP 作用 MCF-7 细胞 24 h 时,G₀/G₁ 期细胞明显增多,而 S 期和 G₂/M 期细胞显著减少,与对照组相比差异有统计学意义(P<0. 05),其中 5. 00 ng/ml 组 G₀/G₁ 期细胞由对照组的 (49. 33 ± 3. 25)% 升高至 (79. 47 ± 2. 40)%,S 期和 G₂/M 期细胞由

对照组的(28.47±1.59)%和(22.20±2.09)%分别下降至(10.13±3.26)%和(10.40±1.41)%。经 CPP 处理的 MCF-7 细胞中 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 的表达明显增强, p21^{WAF1/CIP1}/β-actin 光吸度比值与对照组相比明显增高($P<0.05$)。免疫细胞化学结果显示, CPP 组 MCF-7 细胞中 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达随作用浓度的增加而增强, 其中 10.00 ng/ml 组肿瘤细胞 p21^{WAF1/CIP1} 的表达呈强阳性。**结论** 香加皮杠柳苷(CPP)具有显著的体外抗肿瘤作用, 且有效剂量很小, 其 IC_{50} 仅为(4.88±0.16)ng/ml。CPP 可使 MCF-7 细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞, 并可使细胞周期相关基因 p21^{WAF1/CIP1} 的 mRNA 及蛋白表达增强, 提示阻滞细胞周期可能是 CPP 体外抗肿瘤的作用机制之一。

关键词: 香加皮杠柳苷; 乳腺癌; 抗肿瘤; 细胞周期
中图分类号: R730.52; R737.9 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2010)08-0864-05

0 引言

近年来, 乳腺癌的发病率逐年上升, 在我国发达城市(京、津、沪)已占女性恶性肿瘤发病的首位^[1], 然而目前尚缺乏有效的治疗药物。本实验室前期研究发现中药香加皮(Cortex Periplocae)的提取物对乳腺癌细胞具有显著的抑制作用^[2], 经进一步分离、提纯得到了香加皮的单体化合物杠柳苷(Periplocin)^[3]。本课题在既往工作的基础上, 研究香加皮杠柳苷(Periplocin from Cortex Periplocae, CPP)对人乳腺癌 MCF-7 细胞的细胞周期及其相关基因 p21^{WAF1/CIP1} 表达的影响, 探讨其抗肿瘤作用及机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株及药物

人乳腺癌 MCF-7 细胞株由河北医科大学第四医院科研中心保存。香加皮杠柳苷(CPP)由华北制药集团新药研究开发中心分离纯化。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI1640 培养液为美国 GIBCO 公司产品, 胎牛血清(FCS)为杭州四季青生物工程公司产品, 胰蛋白酶(trypsin)、噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)为美国 Sigma 公司产品, 顺铂(DDP)为齐鲁制药有限公司产品, 羟基喜树碱(HCPT)为黄石飞云制药有限公司产品, p21^{WAF1/CIP1} 和 β-actin 引物由上海生物工程公司合成, Trizol Reagent 为美国 GIBCO 公司产品, RT-PCR 酶混合物、DNA Ladder 为华美生物工程公司产品, 鼠抗人 p21^{WAF1/CIP1} 单克隆抗体为北京中杉金桥生物技术公司产品, SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒为北京中山生物技术公司产品。主要仪器: CO₂ 恒温培养箱(TC2323)(美国 SHELDON 公司), 酶标仪(HT2)(奥地利 Anthos 公司), 定量

PCR 仪(9700)(美国 ABI 公司), 凝胶成像分析系统(美国 Perkin-Elmer 公司), 流式细胞仪(Epics-XL II)(美国 Beckman Coulter 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将人乳腺癌 MCF-7 细胞用含 10% FCS 的 RPMI1640 完全培养液, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2~3 天换液一次, 常规 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 MTT 法检测 MCF-7 细胞的增殖情况 取对数生长期的 MCF-7 细胞, 接种于 96 孔培养板, 每孔细胞数为 1×10⁴。设阴性对照组(RPMI1640 培养液)、0.1% 乙醇(Ethanol)溶剂对照组和 DDP(1 000.00 ng/ml)、HCPT(1 000.00 ng/ml)阳性对照组以及不同浓度的 CPP 实验组(终浓度为 1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 ng/ml), 每组设 3 个平行孔, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱分别培养 24、48、72 h, 实验终止前每孔加入 MTT 10 μl(5 mg/ml)继续培养 4 h, 弃去培养液每孔加入 DMSO 150 μl, 待结晶溶解后用酶标仪于 570 nm 波长测定 OD 值。按下列公式计算细胞生长抑制率(Inhibitory rate, IR): 生长抑制率(%)=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%, 用 POMS 软件计算抑制 50% 细胞生长的药物浓度, 以 IC_{50} 表示。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞周期分布 分别取培养 6、12、24、48、72 h 的 Ethanol 对照组和 2.50、5.00、10.00 ng/ml CPP 组 MCF-7 细胞约 1×10⁶ 个, 以 70% 预冷乙醇固定过夜, PI 染色 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期分布状态。每个浓度、每个时间的样本重复 3 次, 结果以均值表示。

1.3.4 RT-PCR 检测 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 的表达 取对照组和 2.50、5.00、10.00 ng/ml CPP 作用 48 h 的 MCF-7 细胞, 分别提取各组细胞总 RNA, 按 RT-PCR 酶混合物试剂盒说明进行实验, 以 β-actin 为内参照。引物序列^[4] 为 p21^{WAF1/CIP1} 上游: 5'-TTA GGG CTT CCT CTT GGA GAA GAT-3', 下游: 5'-ATG TCA GAA CCG GCT GGG GAT GTC-3', 扩增片段大小为 496 bp; β-actin 上游: 5'-CGCT-GCGCTGGTCGTCGACA-3', β-actin 下游: 5'-GT-CACGCACGATTTCCCGCT-3', 扩增片段大小为 619 bp。反应体系 30.0 μl, 反应条件: 反转录 37℃, 50 min, 预变性 94℃, 5 min, 变性 94℃, 1 min, 退火 52℃, 45 s, 延伸 72℃, 45 s, 循环 30 次, 延伸 72℃, 7 min。将 RT-PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳, 应用 FOTODYNE 凝胶成像系统及 Gel-pro 凝胶分析软件对电泳条带进行分析, 以目的条带与内参照条带的吸光度(A)比值表示目的基因 mRNA 的相对表

达水平(即:目的基因 mRNA 相对含量 = 目的条带吸光度值/ β -actin 条带吸光度值)。

1.3.5 免疫细胞化学检测 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达

取对数生长期的 MCF-7 细胞 1×10^5 接种于含灭菌盖玻片的 6 孔培养板中,设对照组和终浓度分别为 2.50、5.00、10.00 ng/ml CPP 处理组,培养 48 h,制备细胞爬片,采用 SP 法进行免疫细胞化学染色,每次实验均设阴性对照,按 p21^{WAF1/CIP1} 试剂盒操作说明书进行染色、固定、镜下观察。p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达定位于细胞核,呈棕黄色颗粒状染色者为阳性细胞,采用盲法计数进行结果判定,阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为阴性,阳性细胞数 $6\% \sim 75\%$ 为弱阳性,阳性细胞数 $\geq 75\%$ 为强阳性。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 11.5 软件对所有数据进行统计学处理,结果以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间均数比较用 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CPP 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用

MTT 结果显示, Ethanol 溶剂组与阴性对照组比较,细胞增殖差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 不同浓度 (1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 ng/ml) 的 CPP 作用不同时间 (24h、48h、72h) 后, MCF-7 细胞的增殖受到不同程度的抑制, 与阴性对照组和 Ethanol 溶剂组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 抑制率最高可达 $(96.08 \pm 4.16)\%$, 其中 20.00 ng/ml CPP 组与阳性对照 DDP 组及 HCPT 组相比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。CPP 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用随药物浓度的增加和作用时间的延长而增强, 见图 1。CPP 作用 MCF-7 细胞 48 h 的 IC_{50} 为 (4.88 ± 0.16) ng/ml。

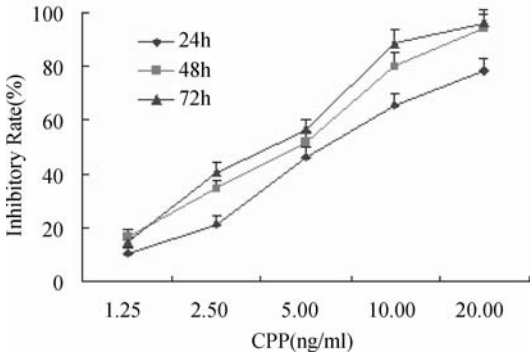


图 1 CPP 对 MCF-7 细胞增殖抑制率的影响
Figure 1 Effects of CPP on the proliferation of MCF-7 cells ($n = 3$)

表 1 CPP 对 MCF-7 细胞的增殖抑制作用 ($n = 3$)
Table 1 Growth inhibitory effects of CPP on MCF-7 cells ($n = 3$)

Groups	OD ₅₇₀		
	24 h	48 h	72 h
Control	1.177 $\pm$ 0.017	1.182 $\pm$ 0.012	1.185 $\pm$ 0.009
Ethanol	1.178 $\pm$ 0.004 ^b	1.181 $\pm$ 0.009 ^b	1.185 $\pm$ 0.011 ^b
1.25 ng/ml CPP	1.045 $\pm$ 0.026 ^{*a}	0.978 $\pm$ 0.015 ^{*a}	1.002 $\pm$ 0.014 ^{*a}
2.50 ng/ml CPP	0.928 $\pm$ 0.016 ^{*a}	0.768 $\pm$ 0.017 ^{*a}	0.696 $\pm$ 0.010 ^{*a}
5.00 ng/ml CPP	0.631 $\pm$ 0.011 ^{*a}	0.563 $\pm$ 0.018 ^{*a}	0.516 $\pm$ 0.009 ^{*a}
10.00 ng/ml CPP	0.407 $\pm$ 0.007 ^{*a}	0.232 $\pm$ 0.012 ^{*a}	0.138 $\pm$ 0.013 ^{*a}
20.00 ng/ml CPP	0.252 $\pm$ 0.011 ^{*ac}	0.070 $\pm$ 0.007 ^{*ac}	0.044 $\pm$ 0.009 ^{*ac}
DDP	0.247 $\pm$ 0.006 [*]	0.076 $\pm$ 0.012 [*]	0.055 $\pm$ 0.010 [*]
HCPT	0.250 $\pm$ 0.005 [*]	0.073 $\pm$ 0.015 [*]	0.054 $\pm$ 0.006 [*]

Note: ^{*}: $P < 0.05$ vs. control group, ^a: $P < 0.05$ vs. Ethanol group, ^b: $P > 0.05$ vs. control group, ^c: $P > 0.05$ vs DDP group and HCPT group

2.2 CPP 对细胞周期的影响

与对照组相比, 3 个浓度 (2.50、5.00、10.00 ng/ml) CPP 作用 MCF-7 细胞后, G_0/G_1 期细胞显著增多, 而 S 期和 G_2/M 期细胞显著减少, 以作用 24 h 时变化最明显。其中, 5.00 ng/ml CPP 作用 24 h 时, G_0/G_1 期细胞由对照组的 $(49.33 \pm 3.25)\%$ 升高至 $(79.47 \pm 2.40)\%$, S 期和 G_2/M 期细胞由对照组的 $(28.47 \pm 1.59)\%$ 和 $(22.20 \pm 2.09)\%$ 分别下降至 $(10.13 \pm 3.26)\%$ 和 $(10.40 \pm 1.41)\%$, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.05$); CPP 作用 48 h 后 G_0/G_1 期细胞有所下降, 但仍高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 2。说明 CPP 可将 MCF-7 细胞阻滞于 G_0/G_1 期。

2.3 CPP 对 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 参照 β -actin (619 bp), 2.50、5.00、10.00 ng/ml CPP 作用 48 h 后, MCF-7 细胞 p21^{WAF1/CIP1} (496 bp) 表达较对照组增强, 且随药物浓度的增加而明显增强, 见图 2。mRNA 相对表达量分析结果显示, 经 CPP 处理的 MCF-7 细胞中 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 表达量明显升高, 10.00 ng/ml 组由对照组的 (0.147 ± 0.007) 升至 (0.540 ± 0.008) , 各浓度组与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。表明 CPP 可上调细胞周期相关因子 p21^{WAF1/CIP1} 的表达, 提示 CPP 诱导肿瘤细胞发生 G_0/G_1 期阻滞可能与 p21^{WAF1/CIP1} 上调有关。

表 2 5.00 ng/ml CPP 对 MCF-7 细胞周期的影响(%, n=3)

Table 2 Effects of 5.00 ng/ml CPP on cell cycle of MCF-7 cells (%, n=3)

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
6 h Control	50.43 ± 3.46	21.40 ± 1.48	27.83 ± 2.21
CPP	56.03 ± 1.27	23.80 ± 0.89	20.17 ± 0.86*
12 h Control	48.53 ± 3.32	33.43 ± 6.15	18.00 ± 4.59
CPP	58.93 ± 2.30*	22.33 ± 0.75*	18.70 ± 2.86
24 h Control	49.33 ± 3.25	28.47 ± 1.59	22.20 ± 2.09
CPP	79.47 ± 2.40*	10.13 ± 3.26*	10.40 ± 1.41*
48 h Control	51.27 ± 4.37	27.37 ± 3.31	21.37 ± 2.57
CPP	63.40 ± 3.54*	19.37 ± 3.57*	17.23 ± 0.42
72 h Control	50.77 ± 3.62	26.03 ± 2.53	23.20 ± 2.05
CPP	58.17 ± 2.74*	25.03 ± 1.69	16.80 ± 1.14*

Note: *: P<0.05 vs. control group

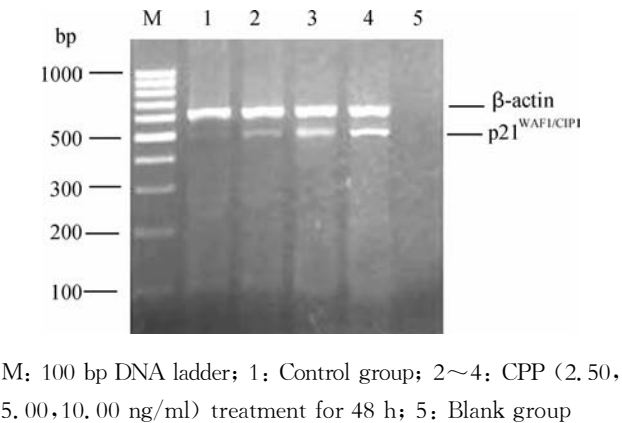
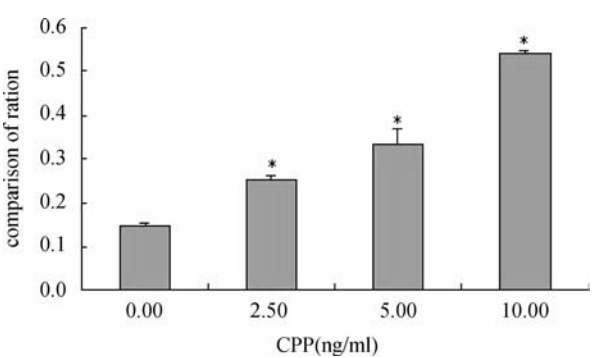


图 2 CPP 对 MCF-7 细胞 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 表达的影响

Figure 2 Effect of CPP on mRNA level of p21^{WAF1/CIP1}

2.4 CPP 对 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达的影响

免疫细胞化学结果显示,与对照组相比,CPP 各处理组作用 MCF-7 细胞 48 h 后,p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达均显著增强,其中 10.00 ng/ml 组呈强阳性表达,见图 4。说明 CPP 在蛋白水平对肿瘤细胞 p21^{WAF1/CIP1} 表达的影响与 mRNA 水平相一致。



*: P<0.05 vs. 0.00 ng/ml group (control group)

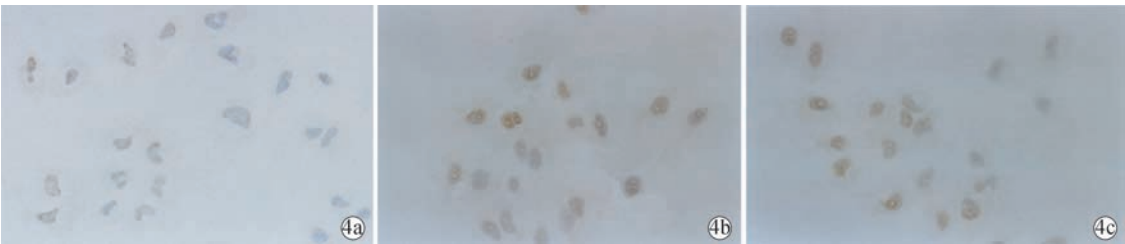
图 3 CPP 作用前后 p21^{WAF1/CIP1} mRNA 相对表达量分析

Figure 3 RT-PCR analysis of p21^{WAF1/CIP1} mRNA expression in MCF-7 cells treated with different concentration CPP for 48 h

3 讨论

本研究通过对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外杀伤实验发现,香加皮杠柳苷(CPP)能显著抑制 MCF-7 细胞的增殖,并呈浓度及时间依赖性,且其有效浓度很低,作用 48 h 的 IC₅₀ 仅为(4.88 ± 0.16) ng/ml,提示 CPP 具有很强的体外抗肿瘤活性。

肿瘤的发生是一个多步骤的复杂过程,其中细胞周期调控紊乱引起的细胞无限增殖,与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[5]。细胞周期调控系统包括细胞周期素(Cyclin)、细胞周期素依赖性激酶(cyclins-dependent kinase,CDK)和细胞周期素依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor,CDKI),以 CDKs 为核心,Cyclins 对其进行正性调控,CDKIs 进行负性调控^[6-7]。调控细胞周期进行细胞增殖的关键点在 G₀/G₁ 期^[8]。本研究应用流式细胞术检测了细胞周期时相的变化,结果发现,CPP 可使人乳腺癌 MCF-7 细胞发生细胞周期阻滞,将细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,于作用 24 h 时最明显,5.00 ng/ml CPP 作用 MCF-7 细胞 24 h,G₀/G₁ 期细胞由对照组的(49.33 ± 3.25)%升高至(79.47 ±



4a:Control group; 4b:2.50 ng/ml CPP group; 4c:10.00 ng/ml CPP group

图 4 CPP 对 MCF-7 细胞 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达的影响(SP×400)

Figure 4 The expression of p21^{WAF1/CIP1} in MCF-7 cells treated with CPP for 48 h (SP×400)

2.40)%,两者差异有统计学意义($P<0.05$),提示 CPP 抗肿瘤机制可能与阻滞肿瘤细胞周期有关。

为了进一步探寻造成肿瘤细胞 G_0/G_1 期阻滞的分子机制,我们选择了与其密切相关的细胞周期素依赖性激酶抑制因子 $p21^{WAF1/CIP1}$ 。 $p21^{WAF1/CIP1}$ 基因定位于人染色体 6p21.2,是 p53 的下游基因, $p21^{WAF1/CIP1}$ 基因编码的蛋白是 CDKI 家族的典型代表,是目前已知具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期负性调节因子^[9-10]。它可通过抑制 CDK2、CDK4 的活性,使细胞不能跨越 G_1 期检查点,发生 $G_1 \rightarrow S$ 期阻滞,诱导细胞停滞在 G_0/G_1 期,从而阻滞细胞周期的进行,抑制肿瘤细胞的增殖^[11-12]。通常, $p21^{WAF1/CIP1}$ 在乳腺癌、胃癌等多种肿瘤细胞中是低表达或表达缺失的^[13-14],有研究发现,通过药物诱导使 $p21^{WAF1/CIP1}$ 表达水平升高,可将细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期,说明 $p21^{WAF1/CIP1}$ 的表达可能是抑制细胞增殖信号转导网络中的重要参与者^[15-16]。

本研究应用 RT-PCR 和免疫细胞化学的方法,从 mRNA 和蛋白水平检测了 CPP 对 MCF-7 细胞中 $p21^{WAF1/CIP1}$ 表达的影响。结果显示,不同浓度 CPP 处理 MCF-7 细胞后, $p21^{WAF1/CIP1}$ 基因的 mRNA 和蛋白表达水平均升高。提示 $p21^{WAF1/CIP1}$ 表达上调可能是 CPP 诱导肿瘤细胞发生细胞周期 G_0/G_1 期阻滞,从而发挥抗肿瘤作用的分子机制,而 $p21^{WAF1/CIP1}$ 可作为 CPP 抗肿瘤药物的作用靶点之一。

本研究结果初步揭示了香加皮杠柳苷(CPP)的抗肿瘤活性及其作用机制,为其进一步开发利用奠定了基础。

参考文献:

[1] 孙燕. 乳腺癌居京津沪女性恶性肿瘤发病首位[J]. 首都医药, 2005, 7(13): 36-38.

[2] 张静, 单保恩, 刘刚三, 等. 香加皮提取物抗肿瘤活性的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2006, 18(2): 108-111.

[3] 陈书红, 杨峻山, 任风芝, 等. 香加皮的抗肿瘤活性成分研究(II)[J]. 中草药, 2006, 37(4): 519-520.

[4] Park WH, Seol JG, Kim ES, et al. Arsenic trioxide mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 and apoptosis[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 3065-3071.

[5] Khan AA, Abel PD, Chaudhary KS, et al. Inverse correlation between high level expression of cyclin E and proliferation index in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Mol Pathol, 2003, 56(6): 353-361.

[6] Chibazakura T. Cyclin proteolysis and CDK inhibitors: two redundant pathways to maintain genome stability in mammalian cells[J]. Cell Cycle, 2004, 3(10): 1243-1245.

[7] Wall SJ, Zhong ZD, DeClerck YA. The cyclin-dependent kinase inhibitors p15INK4B and p21CIP1 are critical regulators of fibrillar collagen-induced tumor cell cycle arrest[J]. J Biol Chem, 2007, 282(33): 24471-24476.

[8] Goulet B, Nepveu A. Complete and limited proteolysis in cell cycle progression[J]. Cell cycle, 2004, 3(8): 986-989.

[9] Gong J, Ammanamanchi S, Ko TC, et al. Transforming growth factor beta 1 increases the stability of p21/WAF1/CIP1 protein and inhibits CDK2 kinase activity in human colon carcinoma FET cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(12): 3340-3346.

[10] Weinberg WC, Denning MF. P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2002, 13(6): 453-464.

[11] Mckenzie PP, Danks MK, Kriwacki RW, et al. P21Waf1/Cip1 dysfunction in neuroblastoma: a novel mechanism of attenuating G_0 - G_1 cell cycle arrest[J]. Cancer Res, 2003, 63(13):3840-3844.

[12] Rosato RR, Almenara JA, Yu C, et al. Evidence of a functional role for p21WAF1/CIP1 down-regulation in synergistic antileukemic interactions between the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate and flavopiridol[J]. Mol Pharmacol, 2004, 65(3): 571-581.

[13] Huang Y, Pledgie A, Rubin E, et al. Role of p53/p21(Waf1/Cip1) in the regulation of polyamine analogue-induced growth inhibition and cell death in human breast cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4(9):1006-1013.

[14] Gamboa-Dominquez A, Seidl S, Reyes-Gutierrez E, et al. Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p27Kip1, p53 and E-cadherin expression in gastric cancer[J]. J Clin Pathol, 2007, 60(7):756-761.

[15] Aquero MF, Facchinetti MM, Sheleq Z, et al. Phenoxodiol, a novel isoflavone, induces G1 arrest by specific loss in cyclin-dependent kinase 2 activity by p53-independent induction of p21WAF1/CIP1[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3364-3373.

[16] Delobel P, Lavenir I, Ghetti B, et al. Cell-cycle markers in a transgenic mouse model of human tauopathy: increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1[J]. Am J Pathol, 2006, 168(3): 878-887.

[编辑:安 凤;校对:黄国玲]